

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-165373

⑪ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)6月29日

C 12 N 5/00

B-8515-4B

C 07 K 13/00

8318-4H

C 12 N 15/00

A-8412-4B 審査請求 未請求 請求項の数 15 (全17頁)

⑭ 発明の名称 インターロイキン2産性組換え真核細胞、その製法とベクターおよびインターロイキン2の製法

⑮ 特 願 昭63-219590

⑯ 出 願 昭63(1988)9月1日

優先権主張 ⑰ 1987年9月1日 ⑱ フランス(FR) ⑲ 87 12166

⑳ 発 明 者 ジョアンヌ・リュブケ フランス国31520 ラモンビル・サン・アニユ、リュ・レ  
ル オン・ビアラ 9番  
㉑ 発 明 者 ブリジット・ミルー フランス国31450 モンジスカール、シヌマン・ド・サフ  
ラナ (番地の表示なし)  
㉒ 発 明 者 ビルム・ロスカム フランス国31450 モンジスカール、マジユレ (番地の表  
示なし)  
㉓ 出 願 人 サ ノ フ イ フランス国75008 パリ、アブニユー・ジョルジュ・サン  
ク 40番  
㉔ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

インターロイキン2産性組換え真核細胞、その  
製法とベクターおよびインターロイキン2の製法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレ  
ートレグクターゼコード化DNA配列およびシグ  
ナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1  
種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド  
前駆体コード化DNA配列を含む、インターロイ  
キン2産性真核細胞。

(2) ハイブリッド前駆体コード化DNA配列が、  
シグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体  
の1種のそれであるヒト起源インターロイキン2  
コード化DNA配列である、請求項1記載の真核  
細胞。

(3) CHO細胞である、請求項1または請求項  
2記載の真核細胞。

(4) 発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレ  
ートレグクターゼコード化DNA配列およびシグ

ナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1  
種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド  
前駆体コード化DNA配列を同時に有するベクタ  
ーによって真核細胞をトランスフェクトし、次い  
で各々が前の培地よりも高濃度のメトトレксеー  
トを含む連続培地中で生育させることにより、イ  
ンターロイキン2を産生するトランスフェクト細  
胞を選択することからなる、請求項1〜3のいづ  
れか1項記載のインターロイキン2産性真核細胞  
の製造法。

(5) 真核細胞がCHO細胞である、請求項4記  
載の方法。

(6) ベクターがジヒドロフオレートレグクター  
ゼおよびインターロイキン2前駆体に対する1箇  
の発現単位のみを有する、請求項4または請求項  
5記載の方法。

(7) ベクターが、一方がジヒドロフオレートレ  
グクターゼに対するもので他方がインターロイキ  
ン2前駆体に対するものである2箇の別々の発現  
単位を有する、請求項4または請求項5記載の方

## 特開平1-165373 (2)

法。

(8)ハイブリッド前駆体が、シグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるヒト起源インターロイキン2コード化DNA配列である、請求項4〜7のいずれか1項記載の方法。

(9)ベクターがプラスミドpSV726およびpSV741のいずれか一方の特徴を有する、請求項4〜8のいずれか1項記載の方法。

(10)発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼコード化DNA配列およびシグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体コード化DNA配列を有する、発現ベクター。

(11)ジヒドロフオレートレグクターゼおよびインターロイキン2前駆体に対する1個の発現単位のみを有する、請求項10記載のベクター。

(12)一方がジヒドロフオレートレグクターゼに対するもので他方がインターロイキン2前駆体に

対するものである2個の別々の発現単位を有する、請求項10記載のベクター。

(13)プラスミドpSV726およびpSV741のいずれか一方の特徴を有する、請求項10〜12のいずれか1項記載のベクター。

(14)インターロイキン2産生真核細胞を培養し、その培養培地を集め、培地中に含まれるインターロイキン2を他の成分から分離することからなる方法であって、培養細胞が、発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼコード化DNA配列およびシグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体コード化DNA配列を同時に有するベクターによってトランスフェクトされ、次いで、各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキセートを含む連続培地中での培養によって選択された、真核細胞に由来するものである、インターロイキン2の製造法。

(15)請求項14の方法によって得られたインターロイキン2。

## 3. 発明の詳細な説明

## [産業上の利用分野]

本発明はインターロイキン2産生組織換え真核細胞に関する。本発明はさらにこれらの細胞を製造する方法とベクターに関する。また、本発明はさらにこれら細胞の培養によるインターロイキン2の製造法に関する。

## [発明の構成]

本発明による真核細胞はその発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼコード化DNA配列およびシグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体コード化DNA配列を含む。

これら組織換え真核細胞は、その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフオレートレグクターゼコード化DNA配列およびシグナルペプチドがヒト生長ホルモン天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体コード化DNA配列を有するベクターによって真核細胞をトラン

スフェクトし、次いで各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキセートを含む連続培地中で生育させることにより、インターロイキン2を産生するトランスフェクト細胞を選択することからなる方法によって得られる。

## [従来の技術および発明の課題]

インターロイキン2はリンホカインの1種である。すなわち、それは抗原またはミトゲン化合物による活性化に反応して哺乳類の成熟Tリンパ球によって分泌される。それは免疫反応に関与する相異なるタイプの細胞の増殖と分化に作用することによって重要な役割をはたす[アール・ジェイ・ロブ(R. J. Robb)(1984)、イミュノロジー・トゥデイ(Immunol. Today)、5、203〜209]。

ヒト起源のインターロイキン2は特別によく研究されてきている。それは3位のスレオニン残基に結合したテトラサッカライドを有する133個のアミノ酸からなる蛋白質である(エイチ・エス・コンラド(H. S. Conrad)ら、(1986)、カ

## 特開平1-165373 (3)

ーボハイドレート・リサーチ(Carbohydr. Res.), 149, 443-450]。成熟Tリンパ球はまず153個のアミノ酸の前駆体としてそれを合成成分とし、次いで小胞体で切断して20個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを除去し、さらにゴルジ装置でグリコシル化したのち、グリコシル化した成熟蛋白質と称する133アミノ酸の蛋白質としてそれを分泌する。

ヒト起源のインターロイキン2の生物学的性質は、ガン、ある種の感染症、寄生虫病などの病気の治療に有用な薬物の有効成分としてそれを使用することを可能にする。この使用には、インターロイキン2をグリコシル化した形で使用するのが好ましいようである。すなわち、実際にサッカライド側鎖は蛋白質を安定化するのに役立ち、これを患者に投与したとき、その耐性を改善するよう思われる。

文献には、健全な末梢リンパ球[イー・エム・ニープ(E. M. Kaiep)ら、(1984)、ヨーロピアン・ジャーナル・バイオケミストリー(Eur.

J. Biochem), 143, 199-203]から、またジュカルト・ラインなどのリンパ芽球[アール・ジェイ・ロブ(R. J. Robb)ら(1983)、プロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 80, 5990-5994]からのインターロイキン2の製造について記載されている。

使用されている方法は、健全なリンパ球の培養に関連した難点のため、また誘導体の必要性のため、不適当であることが証明された。

インターロイキン2をコードする相糖的なDNAのクローニング[ティエ・タニグチ(T. Taniguchi)(1983)、ネイチャー(Nature), 302, 305-310]に続いて、遺伝子工学技術によるインターロイキン2の製造に微生物の利用が可能となったことが報告された。ヨーロッパ特許出願A-0089062は、グリコシル化ができない大腸菌(Escherichia coli)およびCOSモンキー細胞の使用の可能性を示している。ヨーロ

ッパ特許出願A-0172619はとくに中国産ハムスター卵細胞(CHO細胞)を含む、種々の他の動物細胞の使用を開示する。

トランスフェクションの遂行に際して、真核細胞の集団内に、特別のベクターを現実含有した細胞が存在することを示し得るために、その発現がトランスフェクトされた細胞に選択的利点を与え得るようなDNA配列を有することが前記ベクターにとって有用であることも公知である。

【課題の解決手段】

とくに好ましいDNA配列はジヒドロフォレートレグクターゼ(以下、この酵素をdhfrと略す。)をコードする配列である(スブラマニ(Subramani)ら、((1981)、モレキュラー・セル・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 854-864)。発現ベクターによって選ばれるそういった配列は、機能的な状態のdhfrを合成することができない細胞(DHFR-細胞)のトランスフェクション後に、ヒポキサンテン、グリシンおよびチミジン欠いた培地中では、現実にベクターを合体させ

た細胞のみしか生育しないということを可能にする。

その発現に必要な手段と共に、dhfrをコードするDNA配列を有するベクターの使用にかかる興味は、トランスフェクトされた真核細胞が機能的状態のdhfrを合成できる(DHFR+細胞)かあるいは合成できない(DHFR-細胞)にかかわらず、その使用が発現に必要な手段と共に前記ベクターによって選ばれるDNA配列によってコードされた興味ある蛋白質の生産性向上をもたらす増幅方法のはじまりとなりうるという事実によって強化される。この増幅のメカニズムは具体的にはなお不明である。dhfrがメトトレキセート(L-N-(4-((2,4-ジアミノブテリジン-6-イル)メチル)メチルアミノ)ベンゾイル)グルタミン酸)として知られている化合物によって阻害されること、選択的培養培地にメトトレキセートを存在させると大部分の細胞を殺すこと、また生存する細胞は実質的量のdhfrを合成することができるようになった細胞のみであることは、知られてい

る。さらに、その発現に必要な手段と共に、dhfr をコードするDNA配列および他の蛋白質をコードするDNA配列を有するベクターを含有した細胞中で、このdhfrの増産は前記蛋白質の増産を伴うことが発見された[アール・ジェイ・カウフマン(R. J. Kaufman)に(1982)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 159, 601-621]。

本発明者は、その発現に必要な手段と共に、インターロイキン2の天然前駆体をコードするDNA配列とdhfrをコードするDNA配列を同時に運搬するベクターを作成したところ、このベクターは、問題のベクターの1種を合体した真核細胞(およびとくにCHO細胞)の培養において、一時発現の条件下、すなわちその各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキサートを含む連続した培地における培養によって高度な生産ラインを選択する前では、dhfrをコードするDNA配列およびこの配列の発現に必要な手段を欠如する点が異なるベクターを合体させた同じタイプの細胞の培養培地

期待された最初のレベルを達成することが可能になることを認めた、かくして、本発明者は、それに関する判断基準を満足させ工業的規模でインターロイキン2の製造を具体化することを可能にさせる解決を提供しようとするものである。

まず第一の態様として、実際に本発明は、その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフォレートレダクターゼをコードするDNA配列および、そのシグナルペプチドがヒト生長ホルモンの天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2のハイブリッド前駆体をコードするDNA配列を含む、インターロイキン2を産生する組換え真核細胞に関する。

さらに本発明は、1)その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフォレートレダクターゼをコードするDNA配列および、そのシグナルペプチドがヒト生長ホルモンの天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2ハイブリッド前駆体をコードするDNA配列を同時に運搬するベクターによって真核細胞をトランスフェクトし、次いで2)そ

#### 特開平1-165373 (4)

から集めた場合よりも少ない量のインターロイキン2しか培地から集めることを可能にしないことを認めた。

この結果は、健全な末梢リンパ球またはリンパ芽細胞の培養によって得られるインターロイキン2の量の点では有望であるが、他の蛋白質、例えば肝炎Bウイルスの表面抗原またはヒト生長ホルモンについてなされた観察とは反対に、インターロイキン2の製造の場合には、その発現に必要な手段と併用した、dhfrをコードするDNA配列の使用から期待される利点のすべてを引出すことができないことを示す。

本発明者は、さらに検討を継続して、非常に驚いたことには、テストした最初のベクターに関して、インターロイキン2の前駆体をコードするDNA配列の範囲内で、そのシグナルペプチドをコードする部分を、ヒト生長ホルモン(この蛋白質は以下hGHと省略する。)の天然前駆体の1種のシグナルペプチドをコードする配列で置換すると、分泌レベルを改善し、ある種の構成によっては、

の各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキサートを含む、連続した培地中で培養して、インターロイキン2を産生するトランスフェクトした細胞を選択することからなる、前記細胞の製造方法に関する。

最後に、本発明は、インターロイキン2を産生する真核細胞を培養し、その培養培地を集め、次いで培地中に含まれるインターロイキン2を他の成分から分離することからなる、インターロイキン2の製造法であって、培養細胞が、その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフォレートレダクターゼをコードするDNA配列および、そのシグナルペプチドがヒト生長ホルモンの天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2のハイブリッド前駆体をコードするDNA配列を同時に有するベクターによってトランスフェクトされ、次いでその各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキサートを含む、連続した培地中での培養によって選択された真核細胞から得られるものである方法に関する。

## 特開平1-165373 (5)

特記すべきは、この製造法は、ヒト起源のインターロイキン2の製造に特に適するが、それのみならず、かかる分子が、例えば、診断薬としてあるいは、とくに動物用の薬剤中の活性成分としてとくに興味があると共に、工業的利用の価値がある限り、他の動物起源のインターロイキン2の製造にも利用され得る。

自明なことではあるが、この製造法は、天然に産生するTリンパ球から分泌されるグリコシル化されたインターロイキン2の製造を主として可能とすることを意図されたものである。注目すべきことであるが、この方法は、本発明による真核細胞の培養によって培地中に存在する、不完全グリコシル化され、またはグリコシル化されていない状況のインターロイキン2を製造にも適している。

本発明を実施するために使用される真核細胞はグリコシル化ができる動物起源の細胞である。これらの細胞の中で、その起源(中国産ハムスター卵細胞)を引用してCHO細胞と通常呼ばれる細胞がとくに適している。

有するので、メチオニンを除く同じアミノ酸が、2, 3, 4個のコドン、場合によっては6個のコドンによってさえコードされ得る。シグナルペプチドps-hGHをコードする好ましいヌクレオチド配列を第11図に示すが、これは対応するアミノ酸に各々26個のコドンを与える。

前記DNA配列は同じ発現単位中に含まれ得る。それぞれが自律発現単位に属するのが有利である。これら配列の発現に必要な手段は、真核細胞のトランスフェクションを意図したベクターの構成のために一般に使用されるものから選ばれる。それらはSV40のゲノムから好ましくは導かれるが、これらとくに初期促進剤および/または初期アデニル化シグナルを含むDNA配列をとくに製造することができる[ダブリュ・フィアーズ(W. Fiers)(1978)、ネイチャー(Nature)、273、113-120]。

本発明によるベクターの構成は当業者に現在よく知られている技術を必要とする。注目すべきことであるが、前駆体(ps-hGH)-インターロイ

増殖であろうと、ベクターによるトランスフェクションであろうと、その他、現実にトランスフェクトされた細胞の選択であろうと、これら細胞の使用に関連した技術は、当業者に知られている。その一部を実施例の中に十分詳しく記載する。

本発明を実施するのに必要なベクターは、多様な形をとりうる。それらは、ウイルスゲノム、とくにレトロウイルス、プラスミド、その他コスミッドのゲノムの全てまたは一部からなる。プラスミドが有利に使用される。

本発明によるベクターは、その発現に必要な手段と共に、ジヒドロフォレートレグクターゼをコードするDNA配列および、そのシグナルペプチドがhGHの天然前駆体の1種のそれであるインターロイキン2のハイブリッド前駆体[この前駆体は以下に次の記号で略称する:(ps-hGH)インターロイキン2]をコードするDNA配列を運搬する。

シグナルペプチドに対応するコード部分は遺伝子コードの暗号によって認められた配列の1個を

キン2をコードするDNAに関しては、インターロイキン2の天然前駆体をコードするTリンパ球のメッセンジャーRNAに相補的なDNA[例えば、ティー・タニグチ(T. Taniguchi) et al、(1983)、ネイチャー(Nature)、302、305-310またはエックス・デボス(X. Devos)ら(1983)、ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Res.)、11、4307-4323の業績を参照のこと。]を製造したのち、そのシグナルペプチドをコードする配列を、hGHの天然前駆体の1種のシグナルペプチドをコードする配列で置換することが有利である。

ヒト起源のインターロイキン2の製造のために構成される2種の好ましいベクターはプラスミドpSV726(第6図)およびpSV741(第9図)である。それらはそれぞれdhfrの発現単位および前駆体(ps-hGH)-インターロイキン2の発現単位を含む。これら両プラスミドは発現単位におけるイントロンの存在、性質および位置が基本的に異なる。詳述すると、プラスミドpSV726

## 特開平1-165373 (6)

は、dhfrをコードする配列のイントロン下流部ならびに前駆体(ps-hGH)-インターロイキン2をコードする配列のイントロン下流部を運搬する。他方、プラスミドpSV741は前駆体(ps-hGH)-インターロイキン2をコードする配列のイントロン上流部を運搬するが、dhfrの発現単位の範囲にイントロンを持たない。

本発明のなお他の態様によれば、本発明は本発明によるベクターを合体した真核細胞から、その各々が前の培地よりも高濃度のメトトレキサートを含有する連続培地中で前記細胞を培養することによって、選ばれたセルラインに関する。ある培地から次の培地への継代培養は、IL-2の分成のこれ以上の増幅が観察されなくなるまで、続ける。

本発明の実施の態様を下記に示す。それらは勿論単なる例示であって、決して限定を意味するものではない。

## 実施例

一時の発現の条件下にテストした本発明の2例

パー、プレス(Cold Spring Harbor Press)、米国ニューヨーク(New York)によって1982年に出版された、ティー・マニアチス(T. Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning): ア・ラボラトリー・マニュアル(a Laboratory Manual)の題名の著書に記載されている。

下記に記載されるベクターの構成に要する全ての制限酵素は、とくにニュー・イングランド・バイオラプス(New England Biolabs)(米国)により市販されている。

バクテリアファージT4のDNAリガーゼはニュー・イングランド・ニュークレア(New England Nuclear)(米国)から入手できる。

ベクターの構成は第2〜10図によって説明され、それらについては下記のキーが採用された。

— プラスミドpBR322から導かれるDNA配列  
 — SV40のゲノムから導かれるDNA配列

のベクターは以下に実施例として記載される高度な生産性の細胞系の製造および次に得られるヒト起源のインターロイキン2(以下、IL-2と略す。)の特徴付けを次に記載する。

## 1. 両ベクターの構成と一時発現の条件下におけるテスト

## プラスミドpSV726およびpSV741

## 1. 方法

## A/ベクターの構成

ベクターの構成は、とくに制限酵素による存在するベクターからDNAフラグメントの単離、オリゴヌクレオチドの化学合成、バクテリオファージT4のDNAリガーゼなどの酵素を用いて適切な場合その末端の修飾後にこれら種々のフラグメントの組立て、エシエリヒア・コリ(Escherichia coli)における細菌の形質転換後にクローニングによるベクターの選択、および次にその精製を含有する。

それは当業者に周知の技術を要する。

これらの技術は、コールド・スプリング・ハー

XXXXXXXX

マウスのアルファグロビンをコードする遺伝子から導かれるDNA配列

HindIII BamHI

ヒトインターロイキン2の天然前駆体または、チロジン残基が2位でアラニン残基により置換されているバリエーションをコードする配列を構成するDNA配列

Signal

HindIII BamHI

前駆体(ps-hGH)-IL-2をコードする配列を構成するDNA配列

XXXXXXXX

dhfrをコードするDNA配列

## B/ヒト起源のインターロイキン2の天然前駆体をコードするDNA配列の製造

ヒトTリンパ球から単離された、IL-2の前駆体をコードするメッセンジャーRNAに相補するDNAをクローニングした。

得られるヌクレオチド配列は、対応する前駆体

のアミノ酸を上側に示したコドンとしてタクレオチドをグループ化して、第1図に示されるDNA配列(5'-3'要素)に含まれる。

#### C/真核細胞の使用

##### a. 選定

ジー・ウルラウブ(G. Ullrich)とエル・チェイシン(L. Chasin)[(1980), プロシーディングス・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、77、4216-4220]によって選ばれたDHFR-CHO細胞のDXBI1菌株を選定した。

##### b. 一時発現の操作

エル・ソンバイラック(L. Sonpayrac)とケイ・ダナ(K. Dana)[(1981)プロシーディングス・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、78、7575]によって記載されたプロトコルを使用した。

各実験について、5%(v/v)子牛胎児血清(ギ

IL-2-依存マウスT-リンパ球系CTL-2)[ビー・ベイカー(P. Baker)に(1979)ジャーナル・オブ・イクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.)、149、173]の増殖について、C/b項の場合のように集めた培地の生物活性をティー・モスマン(T. Mosmann)[(1983)、ジャーナル・オブ・イミューノロジカル・メソッド(J. Immunol. Methods)、65、55-63]の比色テストによって測定する。リンホカイン・リサーチ(Lymphokine Research)[(1984)、4、193-227]に記載された対照製剤を対照として使用する。

#### 2. プラスミドpSV726

##### A/構成

プラスミドpSV726の構成はプラスミドpSV700から始める(第2図)。

プラスミドpSV700は5個のDNA断片の組み立てから生ずる。

——SV40ゲノム[ダブリュ・フィアーズ(W. Fiers)(1978)、ネイチャー(Nature)、

#### 持開平1-165373 (7)

ブグ(Gibco))を添加したアルファ-MEM(ギブグ(Gibco)、米国)5mlを含む、直径6cmのベトリ皿に $5 \times 10^6$ の細胞を接種する。

37℃で24時間培養したのち、細胞をPBS緩衝液[アール・ダルベッコ(R. Dulbecco)とエム・フォーグト(M. Vogt)、ジャーナル・イクスペリメント・メディシン(J. Exp. Med.)、99(1954)、167]5mlで線し、次いでpH7.3のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、HCl(またはtris-HCl)0.05モル/l、500000ダルトンのDEAE-デキストラン(シグマ(Sigma)、米国)0.2mgおよびプラスミドDNA10μgを加えたアルファ-MEM1mlを添加した。

37℃で7時間培養を行い、細胞をPBS緩衝液5mlで洗浄したのち、子牛胎児血清2%(v/v)を加えたアルファ-MEM5mlを添加した。

次いで、細胞を37℃で4日間培養する。続いて、培地を集め、IL-2タイプ活性を測定するために使用する。

#### D/IL-2タイプ活性の測定

273、113-120]から導かれ、かつこのウイルスの初期プロモーターを含む、342個の塩基対のフラグメントPvuII-HindIII(以下bpと略す)。

——ヒトリンパ球の中で合成されるIL-2の天然前駆体をコードするDNA配列を含む、504bpのフラグメントHindIII-BamHI(第1図)。

——マウスのアルファグロブリンの遺伝子[ワイ・ニシオカ(Y. Nishioka)とビー・レーダー(P. Leder)(1979)、セル(Cell)、18、875-882]から導かれ、かつこの遺伝子の末端イントロンを含む、305bpのフラグメントBamHI-BalI。

——SV40のゲノムから導かれ、かつこのウイルスの初期アデニル化シグナルを含む、133bpのフラグメントHpaI-BamHI、および

プラスミドpBR322[エフ・ポリバル(F. Bolivar)(1977)、ジーン(Gene)、2、

95-113]から導かれる。2672bpのフラグメントBamHI-PvuII。

次いで、フラグメントHindIII-BamHI(第1図のコード要素の5'末端に位置するヌクレオチド配列AGCTTCCACAATGTACAGGは、コドンATGを封入するヌクレオチドの範囲で、エム・コザク(M.Kozak)(1984)、ヌクレック・アッシュッド・リサーチ(Nucleic Acids Res.)、12857-872]によって記載されたコンセンサス配列CCACCATGGに一致する配列を与えるように、合成配列AGCTTCCACCATGGCTAGGで置換される。これはプラスミドpSV703(第3図)を与える。

次いで、プラスミドpSV703のセグメントHindIII-BamHI(その5'→3'ストランドを第12図に示す)の上流部分に位置し、かつIL-2の天然前駆体の修飾シグナルペプチド(このシグナルペプチドは、コザク(Kozak)のコンセンサス配列に一致する配列の採用のため、チロジン残基の代りに2位にアラニン残基を含む)に対応し、

モレキュラー・エンド・セルラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)、1854-864]から導かれる2677bpのフラグメントPvuII-EcoRIで置換される。

プラスミドpSV726は次のものを含む。

——前駆体(ps-hGH)-IL-2のための発現単位。この単位はそのプロモーターとしてSV40の初期促進剤を有する。それは(ps-hGH)-IL-2の前駆体をコードする配列の下流、マウスのアルファグロビンの遺伝子の第2イントロンを含む配列およびSV40の初期ポリアデニル化シグナルを含む。および

——dhfrのための発現単位。この単位はそのプロモーターとしてSV40の初期プロモーターを有する。それは、dhfrをコードする配列の下流部、SV40のゲノム上にグリュ、フィアーズ(W.Fiers)のメソによれば位置4693と4083におけるMboI位置間の配列を含むが、その配列はSV40の1抗原イン

## 特開平1-165373 (8)

同時に成熟IL-2の第一アミノ酸に対応する配列を含むHindIIIとHgiAIの制限部位の間のDNAセグメントは、その5'→3'コード要素が第11図に示される合成された二本鎖オリゴヌクレオチドで置換される。

この合成配列はその9番目のヌクレオチドからhGHの天然前駆体の1種のシグナルペプチド(このシグナルペプチドのアミノ酸配列は第11図に示され、各アミノ酸は対応するコドンの上にある)(以下、hGHのシグナルペプチドと略称する)および成熟IL-2の第一アミノ酸をコードする。

得られたプラスミドはプラスミドpSV706(第4図)である。前駆体は(ps-hGH)-IL-2をコードする配列を有するセグメントHindIII-BamHIを第13図に示す。

最後に、プラスミドpSV706の185bpのEcoRIとEcoRVの制限部位間のフラグメントは、ATCCコレクションにNO.37146として寄託されている、プラスミドpSV-dhfr[エス・スブラマニ(S. Subramani)ら、(1981)、

トロンを含む、およびSV40の初期ポリアデニル化シグナルを含む。この単位はプラスミドpSV2-dhfrから導かれるフラグメントPvuII-EcoRI中に含まれる

B/プラスミドpSV726の使用に関連し

### た利点

比較実験を行った。

プラスミドpSV703、pSV720(下記に示す)およびpSV726を一時発現の条件下に試験した(方法を参照)。各プラスミドによってトランスフェクトされる細胞が能力としてもつIL-2分泌レベルを評価するため、各培養上清液のIL-2タイプ活性を測定した(上記のプロトコルによる)。

プラスミドpSV720(第5図)はプラスミドpSV703の誘導体である。それは、プラスミドpSV703の185bpのEcoRIとEcoRVの間のフラグメントを、プラスミドpSV2-dhfrから導かれる2677bpのフラグメントPvuII-EcoRIで置換することにより得られる。



## 特開平1-165373 (9)

それ故に、プラスミドpSV720とpSV726はdhfrのための同一発現単位を有する。両者は、IL-2の前駆体のシグナルペプチドをコードするそれぞれのDNA配列の点で異なるのみである。

この配列は、プラスミドpSV720の場合、IL-2の天然前駆体のシグナルペプチドのバリエーションをコードし、プラスミドpSV726の場合、hGHのシグナルペプチドをコードする。

下記第1表はこの実験の結果を示す：

第1表

プラスミド	IL-2 活性(U/μg)
pSV703	228 ± 112
pSV720	34 ± 29
pSV726	153 ± 68

この表は、dhfrのための発現単位をプラスミド(pSV703)に導入したと関連して一時発現の条件下に分泌の低下を示す(プラスミドpSV720)。それは、IL-2の天然前駆体のシグナルペプチドのバリエーションをコードする配列を、hGHのシグナルペプチドをコードする配列(プ

ラスミドpSV726)で置換することによって、顕著に分泌レベルを改善し、ひいては原プラスミド(プラスミドpSV703)について定値されたものに実質的に均等なレベルに到達することが可能となることを、明らかに意味している。

## 3. プラスミドpSV741

## A/構成

プラスミドpSV741の構成はプラスミドpSV739(第7図)にはじまる。

プラスミドpSV739は5種のDNAフラグメントの組立てにより導かれる。

—SV40のゲノムから導かれ、かつSV40の初期プロモーターの一部を含む、777bpのフラグメントEcoRV-BglI、

—プラスミドpL1[エイチ・オカヤマ(H. Okayama)とピー・バーグ(P. Berg)(1983)、モレキュラー・エンド・セラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)、3,280-289]から導かれ、かつ、SV40の初期プロモーターのフラグメントEco

RV-BglIの欠失部分および蛋白質VP2の後期メッセンジャーRNA19Sと蛋白質VP1[ダブリュ・フィアーズ(W. Fiers)(1978)、ネイチャー(Nature)、273、113-120]の後期メッセンジャーRNA16Sの両イントロンを含む、239bpのフラグメントBglI、

—リンカーPstI-HindIIIによって拡張されたプラスミドpSV706の521bpのフラグメントHindIII-BamHIからなる、フラグメントPstI-BamHI(第13図)。このフラグメントは前駆体(ps-hGH)-IL-2をコードするDNA配列を含む。

—SV40のゲノムから導かれ、かつこのウイルスの初期ポリアデニル化シグナルを含む988bpのフラグメントBclI-EcoRIおよび

—プラスミドpBR322から導かれる2295bpのフラグメントEcoRI-PvuII。

プラスミドpSV741(第9図)は、プラスミ

ドpSV739のフラグメントBamHI-EcoRIを、フラグメントPvuII-EcoRIで置換することによって得られるが、後者は、SV40のゲノムから導かれ、かつこのウイルスの初期ポリアデニル化シグナルを含む988bpのフラグメントBclI-EcoRIとプラスミドのpSV2-dhfrから導かれるフラグメントPvuII-BglIIとから組立てて得られる。

プラスミドpSV741は下記のものを含む：

—前駆体(ps-hGH)-IL-2の発現単位。

この単位はそのプロモーターとしてSV40の初期プロモーターを有する、それは、IL-2の前駆体をコードする配列の上流部、SV40の2個のイントロンからなる配列およびこの配列の下流部、SV40の初期ポリアデニル化シグナルを有する。および

—dhfrのための発現単位。この単位はSV40の初期プロモーター、dhfrをコードするDNA配列、およびこの配列の下流部、中間体イントロンなしのSV40の初期ポリアデニル

化シグナルを含有する。

Bノ／プラスミドpSV741の使用に関連し

#### た利点

比較実験を実施した。

プラスミドpSV739、pSV741およびpSV742(下記参照)を一時発現の条件下(方法参照)にテストした。

各プラスミドによってトランスフェクトされた細胞が可能とするIL-2分泌レベルを評価するため、各培養地のIL-2タイプ活性を測定した(上記プロトコルに従う。 )。

プラスミドpSV742(第10図)はプラスミドpSV739から構成された。

プラスミドpSV739(第13図)の260bpのフラグメントHindIII-XbaIは、プラスミドpSV703(第3図)の244bp(第12図)のフラグメントHindIII-XbaIによって置換された。得られるプラスミドはプラスミドpSV740(第8図)である。

プラスミドpSV742は、プラスミドpSV7

pSV741	4.6 ± 4
pSV742	7 ± 2

この表は、dhfrのための発現単位をプラスミドpSV740に導入することに関連して一時発現の条件下に分泌の低下を示す(プラスミドpSV742)。それは、IL-2の天然前駆体のシグナルペプチドのバリエーションをコードする配列を、hGHのシグナルペプチドをコードする配列(プラスミドpSV741)で置換することによって、IL-2分泌レベルを顕著に改善することが可能となることを明らかに示す。

#### II. 高度に生産性のあるセルラインの調整

DXB11のDHFR-CHO細胞はプラスミドpSV726とpSV741のいずれかでトランスフェクトされた。

エフ・グラハム(F. Graham)とエー・ファン・デル・エブ(A. Van der Eb)(1973)、ビロロジ- (Virology, 54, 436-539)に記載された操作に従った。

細胞を、10%(v/v)子牛胎児血清、ゲンタマ

#### 特開平1-165373 (10)

40のフラグメントEcoRI-BamHIをフラグメントPvuII-EcoRIで置換することによって得られるが、後者はプラスミドpSV2-dhfrから導かれる1103bpのフラグメントBglII-PvuIIとSV40のゲノムから導かれ、かつこのウイルスの初期ポリアデニル化シグナルを含む、988bpのフラグメントEcoRI-BamHIとの組立てから導かれる。

それ故に、プラスミドpSV741とpSV742はdhfrのための同一の発現単位を有する。両者はIL-2の前駆体のシグナルペプチドをコードするそれぞれのDNA配列の組成の点で異なるのみである。この配列は、プラスミドpSV742の場合、IL-2の天然前駆体のシグナルペプチドのバリエーションをコードし、プラスミドpSV741の場合、hGHのシグナルペプチドをコードする。

下記の第2表はこの実験の結果を示す：

プラスミド	IL-2活性(U/ml)
pSV740	171 ± 10

イシシ20μg/ml、チロシン6.0μg/mlおよびL-グルタミン300μg/mlを含む。アルファ-MEM(ギブコ(Gibco))(以下、非選択的培地という。)中で最初に増殖させた。

洗浄過程を経て、直径10cmのペトリ皿に、8・10<sup>6</sup>の割合で前日に接種した細胞に非選択培地を加え、さらにサケ精子DNAを加えることなしに、リン酸カルシウムの存在下でプラスミド10μgを加える。このようにして得られた細胞を37℃で7日間培養する。

次いで、子牛胎児血清5%(v/v)を含む、アルファ-MEM中で、細胞を37℃で3日間培養する。この培養が終わったとき、細胞を、添加塩を含む最小必須の培地からなり、製品No.041-1095でギブコ(Gibco)によって市販されている、培地を含むペトリ皿に、皿当たり5・10<sup>6</sup>の割合で、分配する。ここで使用される培地に添加したのは次のものである。ギブコ(Gibco)の透析子牛胎児血清(10%、v/v)、ゲンタマイシン(20μg/ml)、チロシン(50μg/ml)、L-グルタ

## 特開平1-165373 (11)

ミン(300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )およびレブロリン(150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。このように補足して、この培地は、下に引用する選択的培地を構成する。

このようにして得られた細胞は37℃で2週間培養され、なお選択的培地は3日ごとに更新する。この培養が終わったときに観察されるコロニーは実際にプラスミドを合体した細胞から主として導かれる。これらのコロニーは分離され、再び別々に培養し、IL-2を産生する能力を確認するために、IL-2タイプ活性を測定することによりテストされる。

かくして、トランスフェクション後に、プラスミドpSV726を有する、347コロニーを単離し、陽性であることを認めた。

最も生産性が高いコロニー(初期細胞数4・10<sup>5</sup>から始まり、4日後に測定したところ、IL-2 35000~50000単位/細胞)を培養した。細胞を4種の組成の選択培地で連続して継代培養し、各培地は、エフ・アルト(F. Alt)ら、[1978)、ジャーナル・オブ・バイオリジカル

モニウムでpH 4.5に平衡化したセファロース(Sephacrose)(商標)アガロース(エス・ファストフロウ・ファルマシア・ファイン・ケミカル(Pharmacia Fine Chemical)、スウェーデン)のカラムによるイオン交換クロマトグラフィーで最初の精製に付す。溶出は、0.5 MのNaCl、次いで0.5 MのNaClを加えた、0.05 M酢酸アンモニウム(pH 5.5)を用いて行われる。

IL-2タイプ活性の測定により生物学的に活性があると認められた、溶出フラクションを合せ、合せたフラクションのプールを逆相カラムによる液体クロマトグラフィーに付す。選ばれた恒体はC<sub>18</sub>-グラフトしたシリカゲルである。カラム寸法は1.0×25.0 cmである。

溶出は、0.1%(v/v)のトリフルオロ酢酸を含む水溶液中5~100%(v/v)濃度勾配のアセトニトリルで流速4 ml/minで80分間行う。

生物学的に活性な溶出フラクションを合せ、合せたフラクションのプールを、寸法2.1×10.0 cmのカラム中C<sub>18</sub>-グラフトしたシリカゲルに

・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、253、1357-1570]により記載された方法にて、前の培地よりも高濃度(0.02.0.05.0.1、次いで0.2  $\mu\text{M}$ )のメトトレキセート(アメトプテリン、シグマ(Sigma))を含有した。この操作の終末段階で、数種の高生産性ラインを選ぶことができた。

すなわち、プラスミドpSV726でトランスフェクトされた、ライン109.12は、培養4日後に、活性で表現して、IL-2分泌レベル250000単位/細胞の能力がある。

### III. ラインによって分泌されたIL-2の特徴付け

II章に記載した高生産性ラインの大規模培養は培養した上澄液を処理し、他の成分を分離したのち、特徴付けができる程度の十分な量の、細胞によって分泌された蛋白質を提供した。

#### 1. IL-2の精製

IL-2は培養上清1リットルから精製した。上澄液をまず濃縮し、予め0.05 M酢酸アン

モニウムでpH 4.5に平衡化したセファロース(Sephacrose)(商標)アガロース(エス・ファストフロウ・ファルマシア・ファイン・ケミカル(Pharmacia Fine Chemical)、スウェーデン)のカラムによるイオン交換クロマトグラフィーで最初の精製に付す。溶出は、0.5 MのNaCl、次いで0.5 MのNaClを加えた、0.05 M酢酸アンモニウム(pH 5.5)を用いて行われる。

生物学活性をもち、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下にポリアクリルアミドゲルによる電気泳動(レムリ(Laemli)(1970)、ネイチャー(Nature)、277.680-685]の結果によればIL-2純度95%以上を有する、このクロマトグラフィーから集めた溶出フラクションのプールは、IL-2を特徴付ける物質を構成する。

#### 2. アミノ末端配列の定量によるIL-2の特徴付け

処理すべきサンプルを、ヘキサジメスリンブromid(またはポリブレン)フィルターの表面上におく。フィルターを、クロマトグラフ(モデル130A-アブライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems))を備えた蛋白質シーケンサー(モデル470A、アブライド・バイオシステムズ、米国)に導入する。これは結局生成したフェニルチオヒダントイン酸誘導体を分析する。

この定量の結果は、天然物について既に公開さ

## 特開平1-165373 (12)

れている配列と一致する[アール・ロップ(R. Ro  
bb)ら(1984)、プロシーディングス・ナショ  
ナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエス  
エー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、81、6  
486-6490]。

この配列のはじめの10個のアミノ酸は次の  
とおりである：

1 10  
Ala-Pro-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Lys-Lys-Thr

アラニンはN-末端の位置で検出される唯一の  
残基である。これは、前駆体(ps-hGH)-IL-  
2が分泌中に誤りなく切断されることを確認さ  
せる。

結論として、これらの実施例は、発現に必要な  
手段を用いて、ジヒドロフォレートレダクターゼ  
をコードする配列を有するベクターによる細胞ト  
ランスフェクションに基づいて、選択および/ま  
たは増幅のシステムに固有の性質を利用すること  
によって、インターロイキン2の製造のために確  
信をもって真核細胞の使用を可能とする、発明の

価値を明白に示す。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、ヒトTリンパ球IL-2前駆体を暗  
号化するメッセンジャーRNAに相補的なDNA  
をクローンして得たDNA配列である。

第2-10図は、それぞれ、ベクターpSV7  
00、pSV703、pSV720、pSV706、  
pSV726、pSV739、pSV741、pSV  
740およびpSV742の構成を示す図である。

第11図は、HindIIIとHgiA1制限部位間の  
DNAセグメントを置換する合成2本鎖オリゴ  
ヌクレオチドを示す。

第12図は、pSV703のセグメントHindIII  
-BamHIのストランドを示す。

第13図は、前駆体(ps-hGH)-IL-2コ  
ード配列をもつセグメントHindIII-BamHIを  
示す。

第14図はプラスミドpSV706の521bp  
フラグメントHindIII-BamHIの配列を示す。

FIG. 2

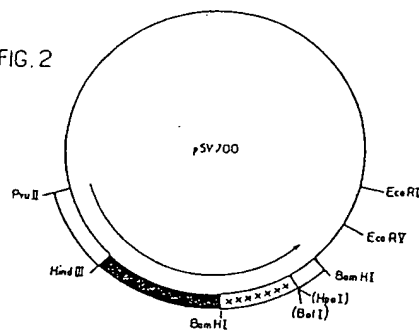


FIG. 3

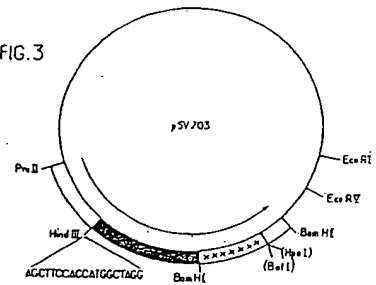
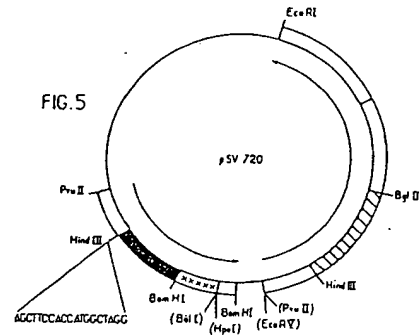


FIG. 5



## FIG.1

-20  
 MET TYR ARG MET GLN LEU LEU SER CYS ILE ALA  
 5' AGCTTCCACA ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA  
 -1 1  
 LEU SER LEU ALA LEU VAL THR ASN SER ALA PRO THR SER SER SER  
 CTA AGT CTT GCA CTT GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT  
 THR LYS LYS THR GLN LEU GLN LEU GLU HIS LEU LEU LEU ASP LEU  
 ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG CAT TTA CTT CTG GAT TTA  
 GLN MET ILE LEU ASN GLY ILE ASN ASN TYR LYS ASN PRO LYS LEU  
 CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC  
 THR ARG MET LEU THR PHE LYS PHE TYR MET PRO LYS LYS ALA THR  
 ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA  
 GLU LEU LYS HIS LEU GLN CYS LEU GLU GLU GLU LEU LYS PRO LEU  
 GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG  
 GLU GLU VAL LEU ASN LEU ALA GLN SER LYS ASN PHE HIS LEU ARG  
 GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGA  
 PRO ARG ASP LEU ILE SER ASN ILE ASN VAL ILE VAL LEU GLU LEU  
 CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA  
 LYS GLY SER GLU THR THR PHE MET CYS GLU TYR ALA ASP GLU THR  
 AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA  
 ALA THR ILE VAL GLU PHE LEU ASN ARG TRP ILE THR PHE CYS GLN  
 GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA  
 133  
 Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr  
 AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAACATATCAG 3'

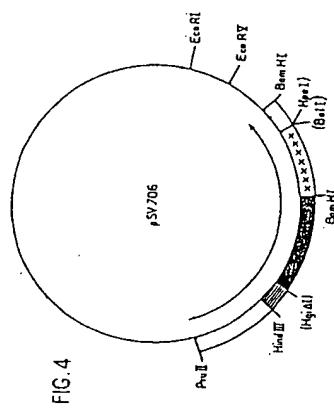


FIG. 4

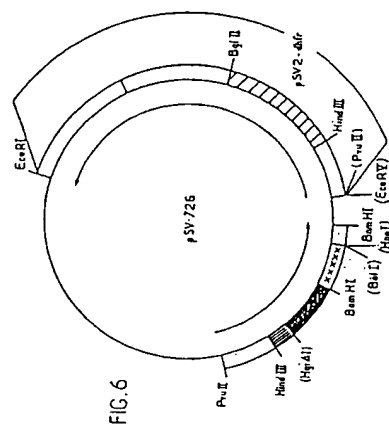


FIG. 6

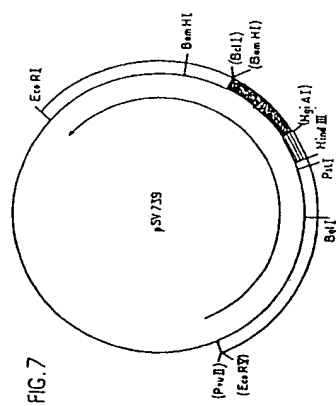


FIG. 7

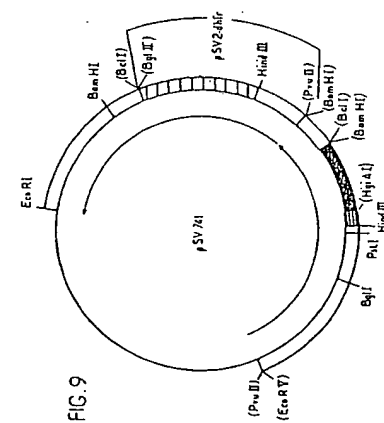


FIG. 9

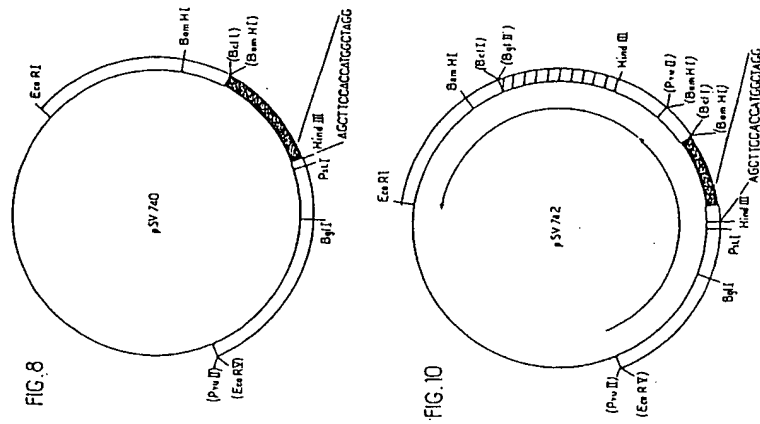


FIG. 11

MET ALA THR GLY SER ARG THR SER LEU  
 -----  
 5' AGCTTACC ATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG

LEU LEU ALA PHE GLY LEU LEU CYS LEU  
 -----  
 CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC CTG

PRO TRP LEU GLN GLU GLY SER ALA ALA 3'  
 -----  
 CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCT GCA

FIG.12

-20  
 MET ALA ARG MET GLN LEU LEU SER CYS ILE ALA  
 5' AGCTTCACC ATG GCT AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA  
 Hind III  
 LEU SER LEU ALA LEU VAL THR ASN SER ALA PRO THR SER SER SER  
 CTA AGT CTT GCA CTT GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT  
 Hga I  
 THR LYS LYS THR GLN LEU GLN LEU GLU HIS LEU LEU LEU ASP LEU  
 ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG CAT TTA CTT CTG GAT TTA  
  
 GLN MET ILE LEU ASN GLY ILE ASN ASN TYR LYS ASN PRO LYS LEU  
 CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC  
  
 THR ARG MET LEU THR PHE LYS PHE TYR MET PRO LYS LYS ALA THR  
 ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA  
  
 GLU LEU LYS HIS LEU GLN CYS LEU GLU GLU GLU LEU LYS PRO LEU  
 GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG  
 Xba I  
 GLU GLU VAL LEU ASN LEU ALA GLN SER LYS ASN PHE HIS LEU ARG  
 GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGA  
  
 PRO ARG ASP LEU ILE SER ASN ILE ASN VAL ILE VAL LEU GLU LEU  
 CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA  
  
 LYS GLY SER GLU THR THR PHE MET CYS GLU TYR ALA ASP GLU THR  
 AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACA  
  
 ALA THR ILE VAL GLU PHE LEU ASN ARG TRP ILE THR PHE CYS GLN  
 GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA  
 133  
 Ser Ile Ile Ser Thr LEU THR  
 AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAACATATCAG 3'



特開平1-165373 (17)

## FIG.13

-26  
MET ALAS' AGCTTACC ATG GCT  
Hind IIITHR GLY SER ARG THR SER LEU LEU LEU ALA PHE GLY LEU LEU CYS  
ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGCLEU PRO TRP LEU GLN GLU GLY SER ALA<sup>-1</sup> ALA<sup>1</sup> PRO THR SER SER SER  
CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCT GCA CCT ACT TCA AGT TCTTHR LYS LYS THR GLN LEU GLN LEU GLU HIS LEU LEU LEU ASP LEU  
ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG CAT TTA CTT CTG GAT TTAGLN MET ILS LEU ASN GLY ILE ASN ASN TYR LYS ASN PRO LYS LEU  
CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTCTHR ARG MET LEU THR PHE LYS PHE TYR MET PRO LYS LYS ALA THR  
ACC AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACAGLU LEU LYS HIS LEU GLN CYS LEU GLU GLU GLU LEU LYS PRO LEU  
GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG

Xba I

GLU GLU VAL LEU ASN LEU ALA GLN SER LYS ASN PHE HIS LEU ARG  
GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGAPRO ARG ASP LEU ILE SER ASN ILE ASN VAL ILE VAL LEU GLU LEU  
CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTALYS GLY SER GLU THR THR PHE MET CYS GLU TYR ALA ASP GLU THR  
AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA TAT GCT GAT GAG ACAALA THR ILE VAL GLU PHE LEU ASN ARG TRP ILE THR PHE CYS GLN  
GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA

133

Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr  
AGC ATC ATC TCA ACA CTG ACT TGA TAATTAAGTGTCTCCACTTAAACATATCAG 3'